

# ELS CULTIUS CEL·LULARS

## COM ALTERNATIVA A L'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

TREBALL DE FI DE GRAU

Realitzat per:

**Mercè Alcoverro Mulet**

Tutoritzat per: **Dra. Marta Llovera Tomas**

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques,  
Grup de Senyalització Cel·lular i Apoptosi,  
Institut de Recerca Biomèdica de Lleida



## ÍNDIX

<b>LLISTA DE SIGLES I ACRÒNIMS.....</b>	<b>II</b>
<b>AGRAÏMENTS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUM.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>3</b>
<b>4. RESULTATS DE LA RECERCA BIBLIOGRÀFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>5. CONTINGUT ESPECÍFIC.....</b>	<b>6</b>
<b>5.1. Mètodes alternatius a l'experimentació animal.....</b>	<b>6</b>
5.1.1. Fonament del mètode read-across (RAx).....	7
5.1.2. Fonament del New Approach Method (NAM).....	8
5.1.3. Fonament del mètode Next-Generation Risk Assessment (NGRA).....	8
<b>5.2. Models cel·lulars simples.....</b>	<b>9</b>
5.2.1. Cultius cel·lulars primaris.....	10
5.2.2. Línies cel·lulars contínues.....	11
5.2.3. Cultius cel·lulars 3D.....	11
<b>5.3. Models biològics complexos que mimetitzen el funcionament dels teixits dins del cos.....</b>	<b>13</b>
5.3.1. Microfluids.....	14
5.3.2. Organ-on-a-chip.....	15
<b>5.4. Aplicacions dels models alternatius a l'experimentació animal.....</b>	<b>16</b>
5.4.1 Models utilitzats en cosmètica.....	16
5.4.2 Models utilitzats per als tests de toxicitat.....	18
5.4.2.1. Toxicitat reproductiva.....	18
5.4.2.2. Toxicologia neurològica.....	20
5.4.3. Models in vitro per a l'estudi de la COVID-19.....	23
<b>5.5. Validació dels mètodes alternatius a l'experimentació animal.....</b>	<b>24</b>
5.5.1. Fonament.....	24
5.5.2. EURL ECVAM.....	25
<b>6. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>26</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>28</b>

## LLISTA DE SIGLES I ACRÒNIMS

ADME	<i>Adsorption, Distribution, Metabolism and Excretion</i>
AOP	<i>Adverse Outcome Pathway</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCEC	<i>Brain Capillary Endothelial Cells</i>
CLP	<i>Classification Labelling and Packing</i>
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CS	<i>Case Study</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECVAM	<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>
ICCR	<i>International Cooperation on Cosmetics Regulation</i>
IR	<i>Infrared spectroscopy</i>
JRC	<i>Joint Research Centre</i>
LAR	<i>Largehead Atractylodes Rhizome</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NAM	<i>New Approach Method</i>
NGRA	<i>Next-Generation Risk Assessment</i>
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
PKB	<i>Physiologically-based Biokinetic</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RAx	<i>Read-Across</i>
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>
RMN	<i>Ressonància magnètica nuclear</i>
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i>
SNC	<i>Sistema nerviós central</i>
UVCB	<i>Unknow or Variable composition, Complex reaction products or of Biological materials</i>
WoE	<i>Weight of Evidence</i>

## **AGRAÏMENTS**

Amb el treball de fi de grau tanco l'etapa de cursar el Grau de Biotecnologia a la Universitat de Lleida, una experiència de constant creixement professional i personal.

Per aquest motiu, m'agradaria donar les gràcies primer que tot a la Dra. Marta Llovera Tomas per acceptar tutoritzar el meu treball. Per la seva ajuda, dedicació, orientació i sobretot, pel seu tracte tant proper que m'ha transmès tot i la distància imposada per una pandèmia.

També agrair al professorat del grau que han posat al meu abast tot d'eines i coneixements per afrontar un nou futur en l'àmbit científic.

Vull fer especial menció, als companys de classe que han acabat sent amics, compartint tot tipus d'experiències i aportant-nos noves visions de veure la vida.

I a la meva família, per creure en mi i donar-me l'oportunitat de poder començar aquesta etapa, donar-me suport en els moments durs del procés i sobretot animar-me a complir els meus reptes.

## RESUM

La toxicologia és l'estudi dels efectes adversos de productes químics en diversos sistemes biològics, i de forma molt especial en els humans. Engloba diferents àmbits com toxicitat per al desenvolupament, teratogenicitat, carcinogenicitat, mutagènesi, immunotoxicitat, neurotoxicitat i alteració endocrina, entre d'altres i per a dur-ho a terme es necessiten una combinació d'eines *in silico*, *in vitro* i *in vivo*. Tot i això, dels estudis realitzats *in vivo* amb models animals se'n pretén reemplaçar, reduir, i/o refinar l'ús (principi de les tres erres) i per a fer-ho hi ha noves opcions alternatives: *Read-Across* (RAx), *New Approach Method* (NAM) i *Next-Generation Risk Assessment* (NGRA), impulsades en gran part gràcies al projecte EU-ToxRisk. Aquesta revisió se centra en els models *in vitro* i algunes de les seves aplicacions concretes (ús en cosmètica, toxicitat reproductiva, toxicitat neurològica i en toxicitat vírica). Els sistemes poden ser més o menys complexos, dinàmics o estàtics, depenent dels punts biològics que es volen testar com pot ser la viabilitat cel·lular, integritat de la membrana, entre d'altres. Hi ha models cel·lulars simples que poden ser cultius cel·lulars primaris, línies cel·lulars contínues o cultius cel·lulars 3D. A més a més, si a aquests se'ls afegeix un grau de complexitat afegint microfluids o accions biofísiques es pot arribar a tenir sistemes més sofisticats com les impressions 3D i els multi-òrgans en un xip. Els models que incorporen una dinàmica de fluids, tensions i intercanvis de nutrients i residus redueixen la distància entre els sistemes *in vivo* i *in vitro*. Per a que finalment un model pugui ser utilitzat de forma regular i a més estigui acceptat, ha de ser validat i demostrar que respon a l'objectiu pel qual ha estat dissenyat. Tot i això, hi ha interrogants per resoldre que requereixen d'una constant investigació científica.

## RESUMEN

La toxicología es el estudio de los efectos adversos de productos químicos en varios sistemas biológicos, y de forma muy especial en los humanos. Engloba diferentes aspectos como son la toxicidad para el desarrollo, la teratogenicidad, la carcinogenicidad, la mutagénesis, la inmunotoxicidad, la neurotoxicidad y alteración endocrina entre otros. Para llevarlo a cabo se necesita una combinación de herramientas *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Aun así, los estudios realizados *in vivo* con modelos animales se pretenden reemplazar, reducir, y/o refinar su uso (principio de las tres erres), y para hacerlo existen nuevas opciones alternativas: *Read-Across* (RAx), *New Approach Method* (NAM) y *Next-Generation Risk Assessment* (NGRA), impulsadas en gran parte gracias al proyecto EU-ToxRisk. Esta revisión se centra en los modelos *in vitro* y algunas de sus aplicaciones concretas (uso en cosmética, toxicidad reproductiva, toxicidad neurológica y toxicidad vírica). Los sistemas pueden ser más o menos complejos, dinámicos o estáticos, dependiendo de los puntos biológicos que se quieren testar como puede ser la viabilidad celular, integridad de la membrana, entre otros. Hay modelos celulares simples que pueden ser cultivos celulares primarios, líneas celulares continuas o cultivos celulares 3D. Además, si a estos se les adiciona un grado de complejidad añadiendo micro-fluidos o acciones biofísicas, se puede llegar a tener sistemas más sofisticados como las impresiones 3D y los multi-órganos en un chip. Los modelos que incorporan una dinámica de fluidos, tensiones e intercambios de nutrientes y residuos, reducen la distancia entre los sistemas *in vivo* e *in vitro*. Para que finalmente un modelo pueda ser utilizado de forma regular y además esté aceptado, tiene que ser validado, además de demostrar que responde a la hipótesis por la cual ha sido diseñado. Aun así, quedan cuestiones pendientes por resolver que requieren de una constante investigación científica.

## **ABSTRACT**

Toxicology is the study of the adverse effects of chemicals on various biological systems, and specially on human ones. It encompasses different areas such as developmental toxicity, teratogenicity, carcinogenicity, mutagenesis, immunotoxicity, neurotoxicity and endocrine disruption, among others. Furthermore, in order to do so, a combination of in silico, in vitro and in vivo tools are required. However, in vivo studies with animal models are intended to be replaced, reduced, and/or refined (the principle of the Three Rs), and there are new alternative options to achieve this aim: Read-Across (RAx), New Approach Method (NAM) and Next-Generation Risk Assessment (NGRA), which are driven in large part by the EU-ToxRisk project. This review focuses on in vitro models and some of their specific applications (use in cosmetics, reproductive toxicity, neurological toxicity, and viral toxicity). The systems can be complex to a greater or lesser extent, dynamic or static, depending on the biological endpoints to be tested, such as cell viability, membrane integrity, etc. There are simple cell models that can be primary cell cultures, continuous cell lines, or 3D cell cultures. In addition, if complexity is increased by adding microfluids or biophysical actions, more sophisticated systems such as 3D printing and multiorgan-on-a-chip can be achieved. Models that incorporate fluid dynamics, stresses, and nutrient and waste exchanges reduce the gap between in vivo and in vitro systems. In order for a model to be finally used on a regular basis and also be accepted, it must be validated, and it has to demonstrate that it meets the objective for which it was designed. Nonetheless, there are unresolved questions that require constant scientific research.



# 1. INTRODUCCIÓ

Totes les indústries abans de treure un producte a mercat han de demostrar que aquest és segur per al públic al qual va dirigit, ja siguin humans o animals i, a més, que sigui el més respectuós possible amb el medi ambient(1). Aquestes tenen diferents exigències depenent del tipus industrial què són i del país en què es troben a causa de les seves regulacions.(2)

La majoria de substàncies que s'avaluen respecte als riscos humans o ecològics són mono-constituent, és a dir, contenen un compost principal com a mínim en un 80% (p/p), fins i tot després de tenir en compte les impureses. També hi ha altres tipus de substàncies multi-constituents i UVCB (*Unknow or Variable composition, Complex reaction products or of Biological materials*) més difícils de testar perquè es tracta de substàncies complexes que contenen un gran nombre de molècules d'hidrocarburs individuals de gran varietat, tenint així diferent complexitat fisico-química, funció, procés de fabricació, especificacions de rendiment...(3)

Aquestes substàncies passen controls i entre ells el toxicològic. Concretament, la toxicologia és l'estudi dels efectes adversos de productes químics en diversos sistemes biològics, inclosos els humans. Conté també la detecció i identificació de possibles efectes adversos, el tractament i la prevenció de malalties provocades pels mateixos. A més, l'estudi de toxicitat per al desenvolupament, teratogenicitat, carcinogenicitat, mutagènesi, immunotoxicitat, neurotoxicitat i alteració endocrina, entre d'altres.(1,4)

En la seva avaluació s'utilitzen models *in silico*, *in vitro* i *in vivo*. L'ús de models animals en la toxicologia permet obtenir resultats acceptables a causa de la complexitat i similitud amb els humans. Un dels principals problemes que sorgeix és l'ús d'un nombre elevat d'animals, ja que per a obtenir un resultat significatiu s'ha de basar en un nombre considerable d'individus(1). De fet, segons la Comissió Europea s'utilitzen aproximadament 10 milions d'animals anuals(2). A Catalunya, segons el departament de Territori i Sostenibilitat, l'any 2004 es van utilitzar 266.817(5) i 237.336 durant el 2019 (6). Es veu una tendència a la baixa, ja que s'ha de tenir en compte que la comptabilització del 2004 no engloba tots els usos que es tenen en compte l'any 2019.

En la determinació de la toxicitat d'un producte, s'han d'utilitzar paràmetres com la dosi letal, que com el seu nom indica, és la dosi que origina mort en els individus, provocant que des d'un

principi un nombre elevat d'animals moriran. Per tant, aquest és un altre problema que s'ha de tenir en compte, ja que a més, estaran sotmesos a condicions d'estrès que s'han d'intentar minimitzar per a no influir en els resultats.

Cal fer menció a la dificultat de reemplaçament dels models animals en la toxicocinètica. Aquesta consisteix en l'estudi de l'absorció, distribució, metabolisme/biotransformació i excreció (ADME) en el temps. S'ha de tenir en compte que els efectes es miren tant en una exposició limitada (toxicitat aguda) com d'exposició a llarg termini (toxicitat crònica) i per a això, es necessita un sistema complet, és a dir, un model animal extrapolable a l'humà.(7)

Les proves en animals per avaluar la toxicitat de productes químics i farmacèutics han de tenir en compte el principi de les tres erres (*Replacement, Reduction and Refinement*). El reemplaçament consisteix en la substitució parcial o total de l'experimentació animal i inclou l'ús de voluntaris humans, teixits i cèl·lules, models matemàtics i informàtics i línies cel·lulars establertes, entre altres. La reducció es refereix a minimitzar el nombre d'animals utilitzats per a l'estudi, però també s'inclouen els que maximitzen la informació recollida per l'animal en un experiment per tal de reduir-ne l'ús d'altres addicionals. I el refinament es proposa minimitzar el dolor, patiment, angouxa o dany envers l'animal i millora del benestar perquè aquests factors poden alterar els resultats.(4,8)

Per tant, l'experimentació animal ha d'estar regida pel principi de les 3R. A més, la seva utilització està subjecta a requisits estrictes d'allotjament i cura dels animals, de captació i formació de personal i d'avaluació de projectes, passant pels diferents òrgans encarregats del benestar animal, comitès d'ètica i òrgans habilitats. També es requereix transparència, aportant així, un informe detallat amb el nombre d'animals utilitzats, la finalitat, la severitat de la prova...(2)

Per aquest motiu, és oportú realitzar un treball de caràcter bibliogràfic per tractar les recents opcions alternatives a l'ús de l'experimentació animal, en l'àmbit toxicològic en especial. Concretament s'aprofundirà en el fonament de *Read-Across* (RAx), *New Approach Method* (NAM) i *Next-Generation Risk Assessment* (NGRA), les noves aproximacions, sent aquestes *in silico*, *in chemico* i *in vitro*. Es detallaran el tipus de models *in vitro* que hi ha segons el tipus cel·lular (cultiu primari o línies cel·lulars) i la seva estructura (2D, 3D o sistemes complexos) i se'n proporcionaran exemples. També es diferenciarien segons el seu àmbit d'aplicació, ja sigui cosmètic, toxicitat reproductiva o toxicitat neurològica. A més, es proporcionarà informació sobre la importància de les noves aproximacions en la pandèmia actual produïda pel SARS-2-COVID-

19. I per últim, es veurà com es validen els nous mètodes per a poder ser aplicats rutinàriament i que donin resultats oportuns als requeriments establerts.

## 2. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball és dur a terme una revisió bibliogràfica sobre els models *in vitro* utilitzats en toxicologia.

Per a dur-ho a terme, es plantegen els següents propòsits:

- (i) Entendre el mecanisme dels models alternatius.
- (ii) Diferenciar els diferents models basats en cultius cel·lulars.
- (iii) Presentar models concrets aplicats en les diferents àrees toxicològiques.
- (iv) Obtenir informació sobre la validació d'aquests mètodes.

## 3. METODOLOGIA

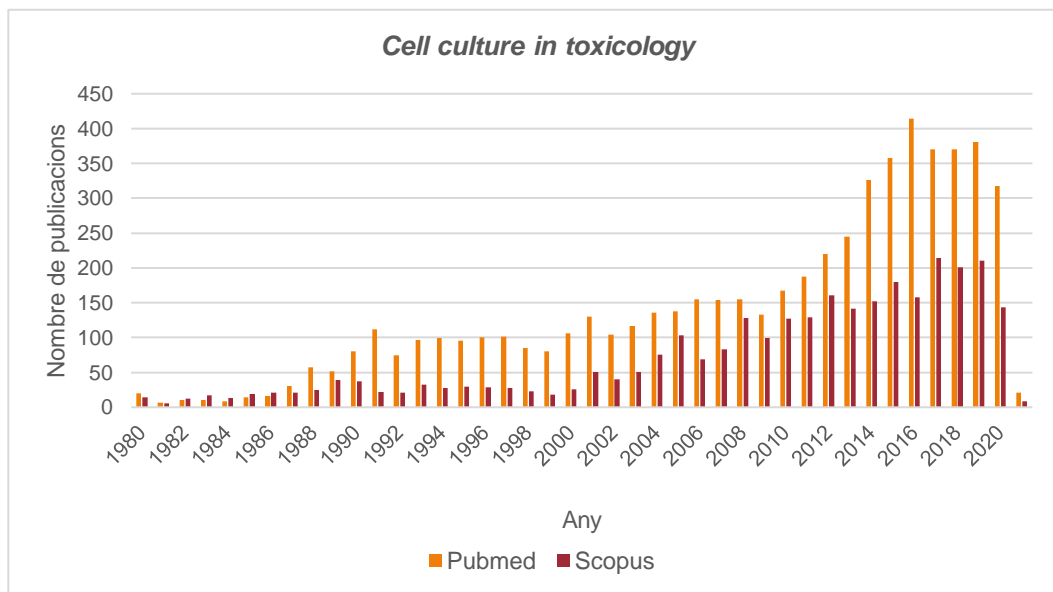
En aquest apartat es detallarà el procediment que s'ha seguit per a fer aquest treball de revisió mitjançant la cerca bibliogràfica. Els motors d'aquesta que s'han utilitzat són diferents bases de dades i revistes científiques de caràcter científic i pàgines oficials d'institucions governamentals o científiques per a l'obtenció de dades específiques. Per a gestionar tota la informació trobada s'ha utilitzat *Mendeley* (versions *Web Importer* i *Desktop*). La cerca d'informació ha estat en anglès perquè gran part del contingut científic està escrit en aquesta llengua.

Primerament per a tenir conceptes bàsics com toxicologia o cultiu cel·lular, entre d'altres, es va buscar llibres referents al tema en la biblioteca en línia de la Universitat de Lleida. Seguidament es van buscar articles en les bases de dades *Scopus*, *Pubmed* i *Google Scholar* utilitzant paraules claus i *boolean operators* (AND, OR i/o NOT) per tal d'acotar la cerca en elements més concrets. A més, amb el mateix fi es van utilitzar filtres; any 2020, ordenar per rellevància i tipus d'article a *review*. Tot i això, també se n'ha inclòs d'altres anys i altres tipus i és a causa de la seva rellevància en l'àmbit científic o per a aclarir algun concepte. A continuació, es van buscar articles o *reviews* en revistes especialitzades com AltWeb-CAAT o ALTEX en l'apartat de publicacions, ja que són específiques de mètodes alternatius a l'experimentació animal, fent també el filtre de l'any. Les xifres oficials d'experimentació animal van estar proporcionades per informes del Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya o per la Comissió Europea.

## 4. RESULTATS DE LA RECERCA BIBLIOGRÀFICA

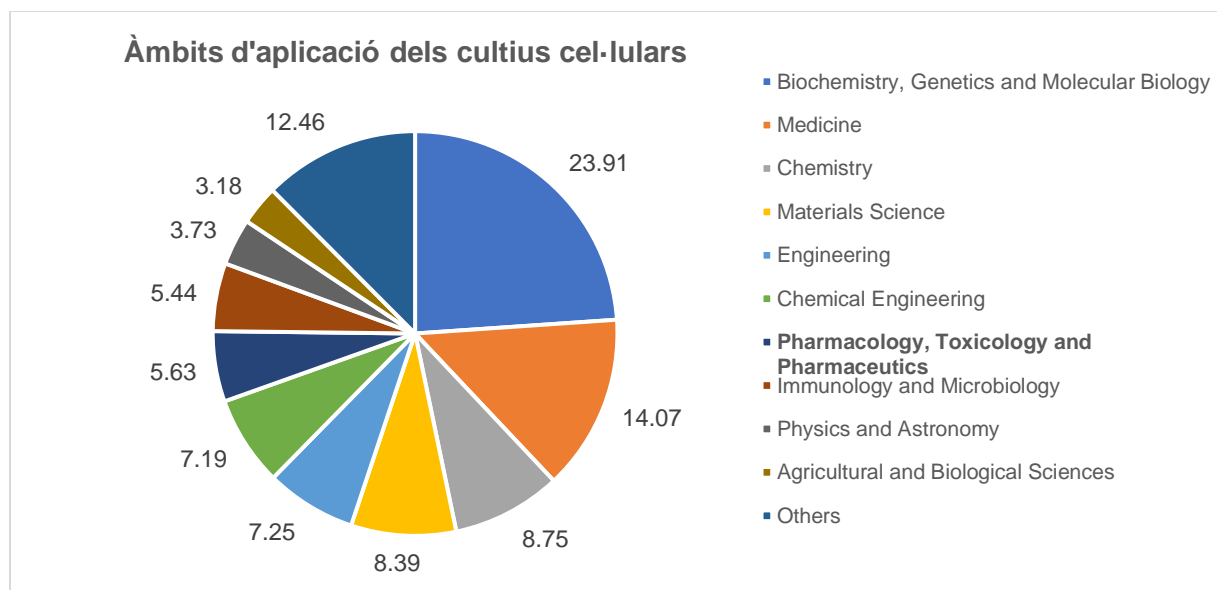
Per a la cerca d'e-books a la biblioteca digital de la UdL, la paraula utilitzada va ser “*toxicology*” i es va ordenar de més nou a més antic. El llibre que es va escollir va ser *Fundamentals of Toxicology: Essential Concepts and Applications* (2016), que tot i no ser molt recent, ha permès entendre i contextualitzar conceptes clau al llarg de tot el treball.

La cerca de publicacions en bases de dades va començar amb una visió general i, al llarg del treball s'ha anat profunditzant i concretant més. En aquest tema, ha estat important utilitzar el filtre de publicacions recents perquè és un tema rellevant, per tant, d'interès per als investigadors. Això es pot veure amb els resultats la primera cerca feta en *Scopus* i *PubMed* i utilitzant com a paraules clau “*cell culture*” AND “*toxicology*” (Figura 1).



**Figura 1:** Nombre de publicacions relacionades amb els cultius cel·lulars i la toxicologia.

Limitat la cerca a les més recents, és a dir, 2020-2021, trobem què apareixen 339 resultats a *PubMed* i 152 a *Scopus*. A més, per tal de conèixer quin és el pes de la toxicologia en els cultius cel·lulars s'ha fet una cerca de “*cell culture*” i s'ha analitzat l'àmbit d'aplicació (Figura 2). S'ha fet una tria i s'han escollit els articles innovadors o que aportaven informació rellevant per al desenvolupament d'aquest treball. Després es van utilitzar altres paraules clau com: “*RAX approach*”, “*NAM*”, “*NGRA*”, “*primary cell culture*”, “*continuous cell culture*”, “*culture 3D*”, “*microfluids*” i “*organ-on-a-chip*”, entre altres.



**Figura 2:** Classificació de les publicacions dels anys 2020 i 2021 segons la seva temàtica a SCOPUS amb les paraules claus "cell culture". S'observa que els cultius cel·lulars s'apliquen en molts camps i els resultats estan diversificats, tot i això, l'àrea predominant és bioquímica, genètica i biologia molecular amb un 23.9% i la toxicologia es troba en setena posició amb un 5.63%.

Tal com es detallarà en contingut de la revisió, els models cel·lulars més complexos són els sistemes microfluídics i *organs-on-a-chip* i és oportú comentar quins són els països capdavaners. Els països en què tenen major percentatge publicacions a *Scopus* amb la utilització de sistemes microfluídics són els Estats Units (31.43%), seguit de Regne Unit (6.53%) i França (6.12%) i en *organ-on-a-chip* són els Estats Units (27.06%), Alemanya (7.06%) i Països Baixos (5.88%).

A més a més, existeixen revistes especialitzades en els testos toxicològics alteratius a l'experimentació animal on s'ha cercat i s'han trobat articles presents en la bibliografia. En primer lloc, ALTEX-*Alternatives to animal experimentation* penja articles d'accés obert i les novetats en les alternatives a l'experimentació animal sent el seu factor d'impacte del 2019 5,787. En segon lloc, el directori de publicacions de CAAT (*Center for Alternatives to Animal Testing*) on es troben articles publicats en revistes com la mencionada anteriorment o *Arch Toxicol* (el factor d'impacte el 2019 és 5,059), entre d'altres. Gràcies a ambdues pàgines, es va aconseguir tenir una contextualització recent de les alternatives a l'experimentació animal i, concretament de l'ús de cultius cel·lulars o sistemes més complexos.

## 5. CONTINGUT ESPECÍFIC

### 5.1. Mètodes alternatius a l'experimentació animal

Hi ha una tendència per incorporar i regular mètodes alternatius a l'experimentació animal amb l'objectiu de definir el perfil toxicològic de les molècules a testar. Són nous mètodes per entendre els efectes tòxics, toxicocinètics i toxicodinàmics de les substàncies tots ells verificats. En aquest apartat se'n detallaran els principis bàsics per a l'aplicabilitat d'aquest nou enfocament.

Primerament, s'identifiquen els perills ja sigui en estudis epidemiològics, estudis en animals, assajos a curt termini o per la similitud estructural, sent aquests els punts finals o *endpoints*. Després s'avalua l'exposició amb la caracterització de poblacions exposades, identificació de les vies i grau d'exposició a diferents nivells: cèl·lula, teixit, òrgan o sistema. A continuació, s'avalua la resposta a la dosi mitjançant la informació de toxicitat quantitativa recollida, establint una relació de resposta i extrapolant les dades dels models a humans. Per últim, es caracteritza el risc amb una estimació dels efectes adversos per a la salut, avaluació de la incertesa i resum de la informació dels riscos. (1,9–11)

Les proves toxicològiques es basen en estudis de casos (CS), com els assajos mitjançant l'enfocament *Read-Across* (RAx). Les aproximacions RAx pretenen obtenir avaluacions basades en respostes *in vitro* i *in silico* per a una millor comprensió dels efectes adversos. Tot i això, els RAx s'enfronten a buits que els *New Approach Method* (NAM) poden cobrir. I la millora d'aquests últims donen lloc als *Next-Generation Risk Assessment* (NGRA). (9,11)

Totes aquestes aproximacions van tenir un gran impuls gràcies al projecte europeu EU-ToxRisk (2016-2020, englobat en el programa *Horizon 2020*). És un projecte de col·laboració entre diferents àrees científiques tals com, disseny de pesticides, seguretat alimentària, productes químics industrials... Es duu a terme mitjançant l'estudi de casos i s'incorporen marcs conceptuals per a integrar NAM per demostrar la hipòtesi de RAx. Tot i això, per a la determinació dels diferents efectes que pugui tenir una substància sobre la salut es necessiten una complementació de proves. (9,11,12)

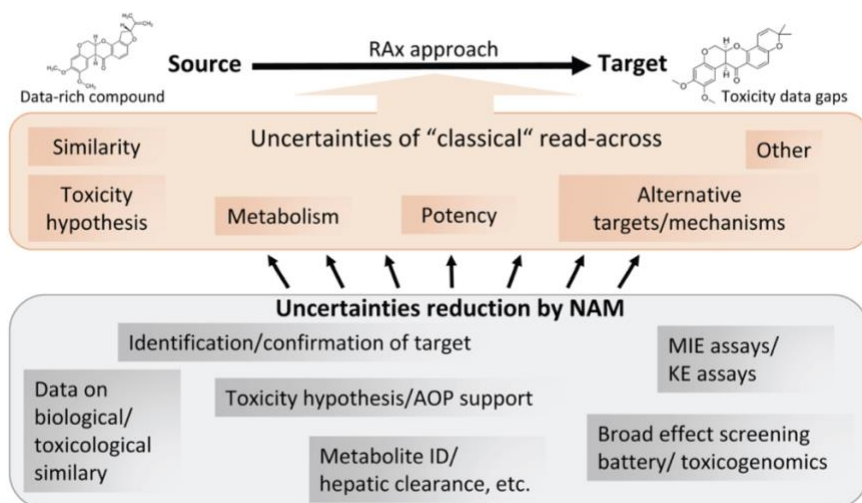
El disseny d'un estudi de cas implica la definició d'una substància objectiu i una qüestió, la delimitació de dades no obtingudes amb anterioritat i els enfocaments per suplir-los. Els CS sempre contenien alguns anàlegs químics amb dades de punts finals *in vivo*, de manera que es podia verificar la predicció i precisió de les dades NAM. Per la mateixa raó, aquests CS també

inclouen compostos estructuralment similars que no presentin patrons d'efecte toxicològic. Posteriorment, s'utilitzen dades NAM per definir millor els límits de les categories i reduir les incerteses. Els CSs tenen un impacte positiu per a RAX i són rellevants en una i l'impacte la futura avaluació de riscos de nova generació.(9)

### 5.1.1. Fonament del mètode read-across (RAX)

Les aproximacions es basen en la similitud estructural entre les diferents substàncies i l'objectiu. De manera que com més gran sigui la base de dades, probablement més informació es pot obtenir, tot i això, la fórmula química no prediu prou la toxicitat.

Primerament, es defineixen tant l'estructura química com el contingut relatiu de cada component de les substàncies objectiu, ja siguin multi-constituents com mono-constituents, amb l'ajuda de tècniques com la ressonància magnètica nuclear (RMN), espectrometria de masses (*mass spectrometry*, MS) i infraroig (IR). Després, s'identifiquen possibles substàncies origen, els criteris de selecció consisteixen en la similitud química de les substàncies, vies metabòliques i esdeveniments moleculars i, per a això es necessiten eines informàtiques, de les quals les més utilitzades són QSAR i SAR. S'obtenen dades categoritzades que permetran identificar vies biològiques que puguin estar implicades en un efecte advers. A continuació, es formula una hipòtesi RAX que la seva confirmació necessita un conjunt d'assaigs i proves experimentals. Solament s'acaben realitzant proves *in vivo* en el cas que s'hagin considerat totes les altres opcions. Tot i això, presenten incerteses que no poden cobrir, com ara qüestions de metabolisme, potència, altres *targets*,...

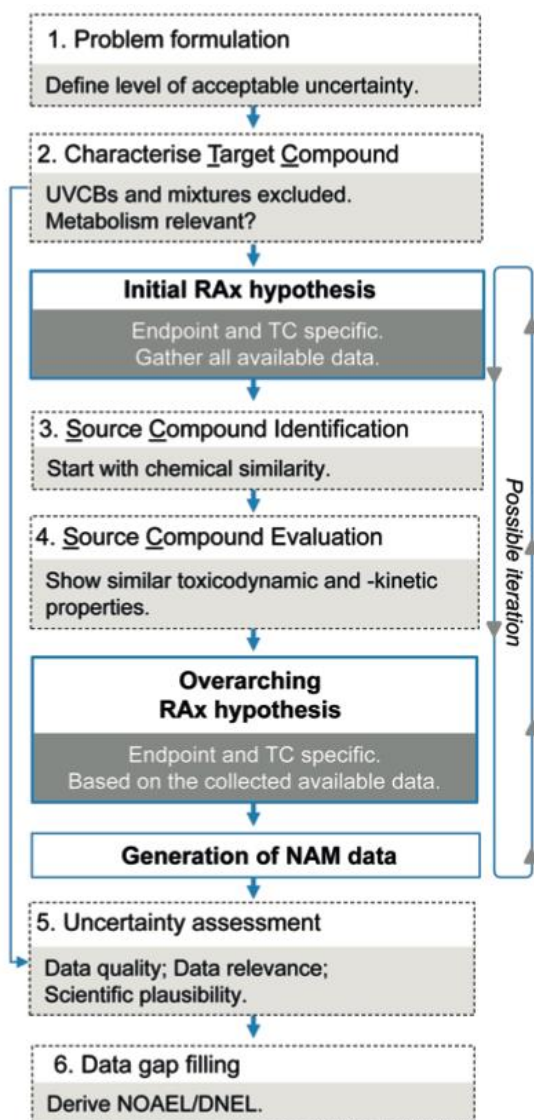


**Figura 3.** Representació de les incerteses produïdes per RAX (quadre superior) i el mode en què ho cobreixen NAM (quadre inferior). Per exemple, les incerteses són la similitud entre la substància objectiu i la font, sobre el metabolisme o la potència i aquestes es reduïren gràcies a dades relacionades amb potència mitjançant assajos d'esdeveniments claus, esdeveniments d'iniciació molecular o identificació de metabòlits rellevants.(9)

### 5.1.2. Fonament del New Approach Method (NAM)

Els mètodes amb noves aproximacions sorgeixen per la necessitat d'omplir els buits de les aproximacions anteriors. Així que reforcen la hipòtesi de RAx proporcionant dades per confirmar si un grup de substàncies comparteix el mateix mecanisme biològic o mostren comportaments similars. Tots els membres d'un grup de substàncies similars es proven simultàniament amb el mateix mètode prova i, els resultats s'avaluen com a categoria demostrant similituds i diferències o intentant trobar la relació entre l'estructura química amb l'activitat biològica. Es poden realitzar una gran quantitat de tècniques *in silico* i *in vitro* organitzades per a identificar un esdeveniment clau d'un efecte advers provocat per la substància en concret. Això s'aconsegueix començant per detallar tot un ampli ventall de possibles esdeveniments a diferents nivells biològics i anar acotant. (9,11)

Per tant, els NAM acaben permetent: relacionar els esdeveniments moleculars amb els resultats *in vivo*, establir vincles casuals, organitzar la informació en diferents nivells biològics (WoE), ser una base per al desenvolupament de nous perfils i per establir relacions de resposta a resposta. A més, desenvolupar i justificar escenaris d'avaluació, avaluació dirigida i eficient que acaben permetent estalviar temps i recursos. (9,11)



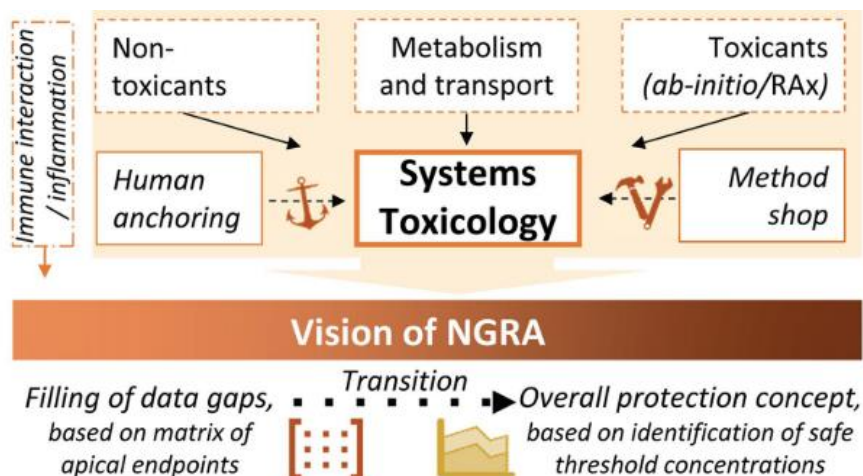
**Figura 4.** Diagrama de flux del funcionament de NAM partint de RAx. Es pot veure com a partir d'una hipòtesi RAx inicial s'arriba a una generació de dades NAM amb més rellevància.(11)

### 5.1.3. Fonament del mètode Next-Generation Risk Assessment (NGRA)

Els *new approach methods* encara no responen a totes les preguntes que generen les proves toxicològiques degut a això està sorgint una altra alternativa per a l'avaluació de riscos els *next-generation risk assessment*. Aquests utilitzen la quantificació de riscos basada en NAM en combinació en escenaris d'exposicions definits i models d'exposició. Implica que els resultats no



només estan en llindars de concentracions associats al perill (extrapolacions de dosis/exposicions respectives), i quantifiquen les incerteses. D'aquesta manera cobreixen incerteses com que es requereixen mètodes més quantitativs per predir la influència del metabolisme i del transport sobre el perill de nous compostos, a més, agilitzar el procés de plantejament d'hipòtesi de compostos amb poca o cap informació prèvia. També avaluen el risc de falsos negatius i prediuen les respostes immunes implicades en la toxicitat i les possibles conseqüències cròniques de salut.



**Figura 5.** Representació dels elements d'avaluació de risc de nova generació (NGRA), entre ells es troben aspectes com el metabolisme i transport, tenir en compte tant els compostos tòxics com els no tòxics, utilització de sistemes integratius amb proves humanes. A més, incorporen l'avaluació de la resposta immune i possibles seqüeles cròniques.(9)

## 5.2. Models cel·lulars simples

Els models *in vitro* presenten un conjunt d'avantatges envers l'ús de models animals sencers:

1. Permeten un control precís del medi ambient, és a dir, es poden controlar els factors que s'afegeixen als medis de cultiu i, per tant, es pot definir estrictament quina acció té la substància en concret. En canvi, en models animals la substància pot provocar una combinació d'efectes que no es poden controlar.
2. Permeten l'estudi dels efectes directe de toxines sobre cèl·lules o teixits específics en un entorn controlat.
3. Permet una caracterització i homogeneïtat en la mostra.
4. La quantitat de producte a testar és molt més petita que si s'ha de fer en un organisme sencer.
5. Els cultius cel·lulars es mantenen i s'utilitzen sense provocar cap dany a un organisme viu.

Tot i això, els models *in vitro* presenten mancances perquè és difícil predir tots els efectes sistèmics provocats per la substància en concret. A més, s'ha de fer un subministrament adequat de factors de creixement. És una tècnica molt fàcil de ser contaminada i si fos el cas, l'experiment no seria vàlid, per la qual cosa és important disposar d'un laboratori adequat i treballar correctament per a mantenir l'asèpsia. Pel que fa a la quantitat de cèl·lules és menor que si s'utilitzés el model animal i poden acumular canvis genètics al llarg del seu manteniment. Per l'aprovació de la utilització d'un model *in vitro* s'ha de validar per demostrar que les cèl·lules compleixen les característiques essencials del model original. És important que tots els models aconseguits puguin ser reproduïbles.

Hi ha diversos tipus de cultius cel·lulars disponibles per a les proves *in vitro* oferint així un ampli ventall d'aplicació. Els cultius cel·lulars presenten diferents graus de complexitat i de semblança amb el sistema original.

Totes les cèl·lules definides es troben en els bancs de teixits com ATCC, DSMZ, ECACC, Gaslini, sent l'última específica per tumors i la penúltima la col·lecció europea. Aquests s'encarreguen de guardar, preservar i fer créixer les línies cel·lulars definides i amb les característiques específiques.

#### 5.2.1. *Cultius cel·lulars primaris*

Els cultius cel·lulars primaris provenen de cèl·lules aïllades a partir d'un teixit animal o humà on s'ha trencat la matriu extracel·lular inicialment. Si les cèl·lules tenen capacitat de dividir-se *in vitro*, quan es fa el subcultiu, aquest passa a ser el cultiu secundari que es pot subcultivar un nombre finit de vegades, tot i que passades unes generacions pot haver-hi deriva genètica afectant així les propietats fenotípiques rellevants en toxicologia. Com que són derivats de teixits i no es modifiquen són més similars a l'estat de les cèl·lules *in vivo* i presenten una fisiologia normal. Per aquest motiu, s'utilitzen per a l'estudi de la fisiologia i bioquímica de les cèl·lules com per exemple, estudis metabòlics, envelliment i estudis de senyalització. També serveixen per estudiar els efectes de substàncies potencialment tòxiques sobre les mateixes cèl·lules, és a dir, en toxicitat basal com per exemple, estudis de viabilitat mitjançant la determinació de la integritat de la membrana per exclusió de colorants o per alliberament d'enzims cel·lulars, assajos funcionals amb la determinació de components metabòlics necessaris per al creixement cel·lular, entre altres. Les línies cel·lulars diferenciades s'utilitzen per a fer cribratge i estudis de mecanismes de toxicitat per al desenvolupament o toxicitat específica cel·lular. Tot i això, les

cèl·lules que provenen de diferents donants es comporten de manera diferent en resposta a les citocines proinflamàtòries, per tant, el creixement del mecanisme regulador metabòlic que existeix *in vivo* està absent *in vitro*. (1,13,14)

Els tipus de cèl·lules primàries més populars que s'utilitzen en la investigació són les cèl·lules epitelials, els fibroblasts, els queratinòcits, els melanòcits, les cèl·lules endotelials, les cèl·lules musculars, les cèl·lules mare hematopoètiques i mesenquimals.(1,13,14)

### 5.2.2. *Línies cel·lulars contínues*

Les línies cel·lulars són més complexes que les anteriors i es componen d'un sol tipus cel·lular. A partir dels cultius primaris es transformen mitjançant un virus, un agent químic o inclús espontàniament i es tornen immortals tenint una naturalesa semblant a la d'un tumor. És important mantenir alíquotes congelades per evitar el cúmul de canvis genètics. El seu origen pot ser també tumors clínics reals. Les línies cel·lulars transformades presenten l'avantatge d'una disponibilitat quasi il·limitada, però l'inconvenient d'haver conservat molt poc de les característiques *in vivo* originals.(1,13,15)

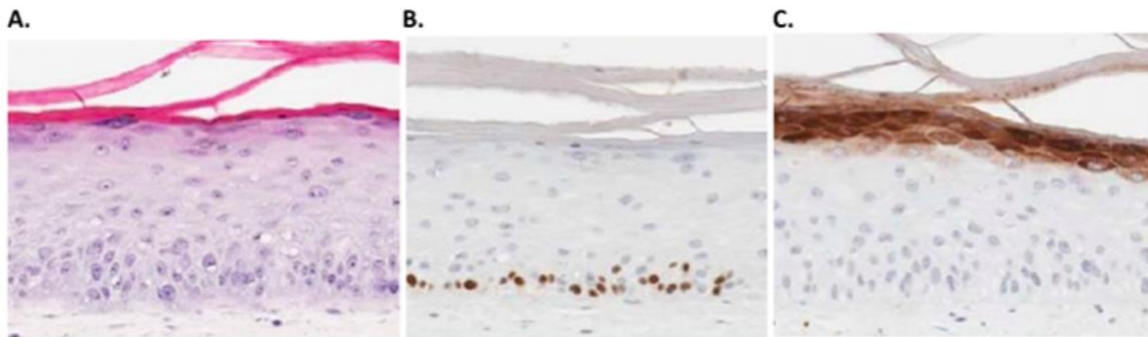
S'utilitzen per a estudiar el creixement, la diferenciació i la senescència cel·lular. En investigació, també s'apliquen en immunologia, hematologia, càncer, biologia molecular i toxicologia. S'usen en toxicitat per al desenvolupament embrional o específica de les cèl·lules diana. És a dir, per tal de testar trets específics, tals com alts nivells de receptors específics, resistència a fàrmacs... es creen línies cel·lulars clonals que deriven de la divisió mitòtica d'una sola cèl·lula. Aquests presenten una genètica molt similar al sistema objectiu. (1,13,15)

Els fibroblasts 3T3 (provinents d'embrió de ratolí), cèl·lules HeLa (provinents de cèl·lules tumorals de cèrvix humà), HEK293 (cèl·lules embrionàries humanes de ronyó) i cèl·lules CHO (cèl·lules d'ovari de hamster xinès) en són exemples de línies utilitzades freqüentment.(13)

### 5.2.3. *Cultius cel·lulars 3D*

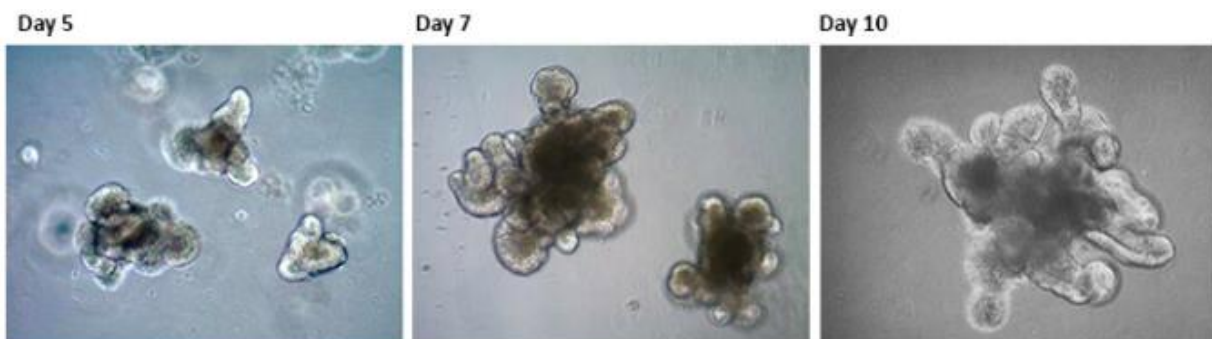
Les cèl·lules en el seu entorn fisiològic tenen una interacció amb la matriu extracel·lular, regulant funcions biològiques complexes com la migració cel·lular, l'apoptosi, la regulació transcripcional i l'expressió dels receptors. Des de la introducció de tècniques de cultiu cel·lular, les cèl·lules s'han cultivat en dues dimensions, unides a materials plàstics de cultiu de teixits o proteïnes de fixació de la matriu extracel·lular, fent que no es puguin reproduir senyals cel·lulars entre les

cèl·lules i la seva matriu. En canvi, els cultius tridimensionals serveixen com a model que representa d'aprop les condicions fisiològiques *in vivo* ja que si que poden simular algunes de les interaccions. Actuen com a sistema model per estudiar la biologia i la bioquímica cel·lular, la interacció entre cèl·lules i agents causants de malalties (com bacteris, virus), l'efecte dels fàrmacs, el procés d'envelliment, la cèl·lula senyalització i regulacions metabòliques. Tot i això, la durabilitat és curta però en alguns casos poden durar diverses setmanes. A més, tot i tenir interaccions cel·lulars no hi ha interacció amb el sistema immunitari i circulatori. Un exemple de cultiu organotípic és la pell humana artificial que s'utilitza per provar molècules cicatritzants, entre d'altres. (1,13,16,17)



**Figura 6.** Models de pell humana 3D (fibroblasts dèrmics, queratinòcits i melanòcits) per testar cosmètics. A. Tinció hematoxilina-eosina B. Tinció amb BrdU C. Tinció amb filaggrina (14)

Un altre tipus de cultiu 3D són els organoides. Aquests són agregats de cèl·lules 3D *in vitro* derivades de teixits primaris o cèl·lules mare que són capaços d'autorenovar-se, autoorganitzar-se i simular la funcionalitat dels òrgans. Contenen una petita població de cèl·lules mare autorenovables que es poden diferenciar a cèl·lules amb funcions diferents, depenent de la seva potencialitat, simulant a condicions fisiològiques. (1,13,16,17)



**Figura 7.** Organoides de l'epiteli intestinal de ratolí a partir de teixit intestinal adult en diferents dies de desenvolupament, a mesura que van avançant formen estructures més complexes.(16)

### 5.3. Models biològics complexos que mimetitzen el funcionament dels teixits dins del cos

Moltes de les tècniques més complexes s'han desenvolupat gràcies a la possibilitat de cultivar cèl·lules mare. Són cèl·lules amb capacitat d'autorenovació i sota les condicions adequades i els estímuls correctes es poden induir a què es diferenciïn donant lloc a una especialització i expressió pròpia de les cèl·lules del teixit en concret. Es poden obtenir cèl·lules funcionals madures. Tot i això, hi ha diferents tipus de cèl·lules mare depenent del seu potencial: poden ser totipotents, pluripotents (ESC) i multipotents (ASCs). Les primeres tenen una capacitat proliferativa il·limitada, les segones són embrionals i poden originar diversos tipus cel·lulars i teixits (~200 tipus cel·lulars) i les últimes, provenen de llocs determinats de l'adult i tenen una capacitat proliferativa limitada.

A més a més, amb l'objectiu de perfeccionar cada cop més els models, s'ha integrat l'estimulació biofísica sobre les cèl·lules que provoca respostes específiques i es poden dur a terme en xips d'òrgans, sistemes microfluids o estructures 3D. Amb aquest fenomen permet avançar en processos citotoxicològics. Aquests estímuls poden ser tensió de cisallament, poden imitar el comportament de fluids extracel·lulars, variació de la composició de la matriu extracel·lular, rigidesa, pressió o tensió. (18)

En condicions fisiològiques *in vivo* les cèl·lules estan constantment amb tensió a causa de les cèl·lules veïnes i el moviment de fluids per això amb la biomecànica dinàmica es provoca la modificació de la curvatura/tensió de la membrana, redistribució de les proteïnes transmembrana, modulació dels fluxos iònics a través dels canals iònics, deformació d'elements citonucleoesquelètics i reorganització d'òrgànuls intracel·lulars. És a dir, es poden observar canvis en l'adaptació de la morfologia, la diferenciació cel·lular i el metabolisme. Per tant, en el cas que hi hagués algun tòxic que afectes aquests canvis es detectaria la toxicitat. (18)

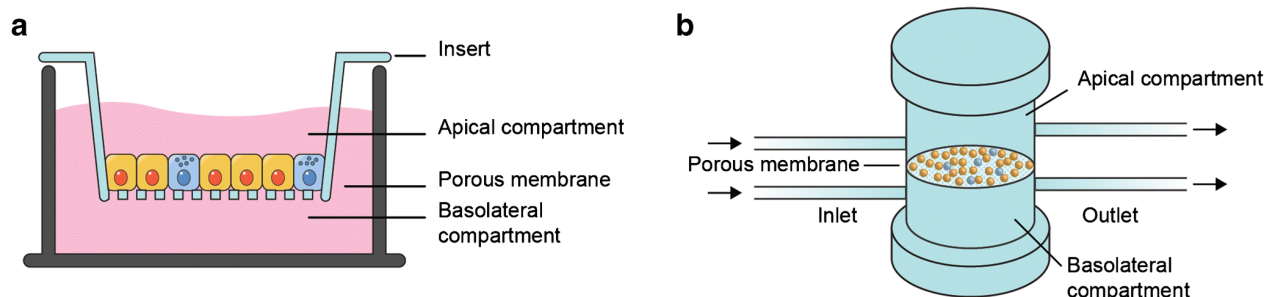
Com cada cop són més sofisticats els sistemes, comencen a apuntar models per a l'obtenció de dades toxicocinètics fent que el cultiu cel·lular amb les senyals adequades pugui ajudar a reproduir processos *in vitro* que caracteritzen l'adsorció, distribució, metabolisme i excreció (ADME, *Adsorption, Distribution, Metabolism and Excretion*) *in vivo*. L'absorció s'avalua a nivell intestinal concretament amb l'absorció de nanoportadors de fàrmacs en cultius de cèl·lules Caco-2 (per exemple) en suports permeables, tot i què també pot incorporar altres tipus cel·lulars i se li afegeix tensió tallant i deformació mecànica, comprovant així que a major tensió aplicada menys absorció. Els fenòmens de distribució es veuen gràcies als cultius en contacte amb gradients

físics i químics. Pel que fa al metabolisme, és un camp molt ampli, ja que inclou funció mitocondrial, metabolisme dels xenobiòtics, autofàgia... un exemple en són les cèl·lules endotelials que poden sincronitzar el metabolisme de l'àcid araquidònic gràcies a l'estrès de cisalla i deformació del substrat cíclic. I per últim, en l'excreció les cèl·lules epitelials renals estan sotmeses a un constant estres de cisallament i deformació del substrat de manera que en la plataforma d'un òrgan de xip permeten reproduir processos de filtració *in vitro*. (18)

### 5.3.1. Microfluids

Els microfluids pretenen representar l'entorn del cultiu de cèl·lules objectiu per així entendre millor les relacions que s'hi produeixen. Poden ser estàtics o dinàmics, constar de mono o co-cultiu i poden estar adherits a xips o a sistemes més complexos. (18–20) Aquesta àrea de recerca ha donat com a resultat models per cobrir barreres situades en diferents parts del cos com l'intestí o el cervell i cobrir paràmetres toxicològics d'avaluació de la integritat i la permeabilitat o estudis de transport. (19,20)

El model dinàmic d'intestí en un xip és el que imita millor el microambient *in vivo* de l'intestí (Figura 8b). Concretament s'ha dissenyat una tècnica per mesurar la permeabilitat del fàrmac i analitzar la formació de productes desconeguts a través d'una capa epitelial intestinal de cèl·lules Caco-2 i HT29-MTX cultivades en un sistema de flux Transwell de flux. A més, la cromatografia líquida d'alt rendiment basada en xips es va acoblar al sistema Transwell dinàmic mitjançant una sèrie de vàlvules de commutació, permetent així mesurar alternativament els costats apical i basolateral. Permetent una imitació del flux de fluids i les condicions de tensió tallant que es troben en situació fisiològica, millorant així els sistemes de Transwell estàtics (Figura 8a). (19)



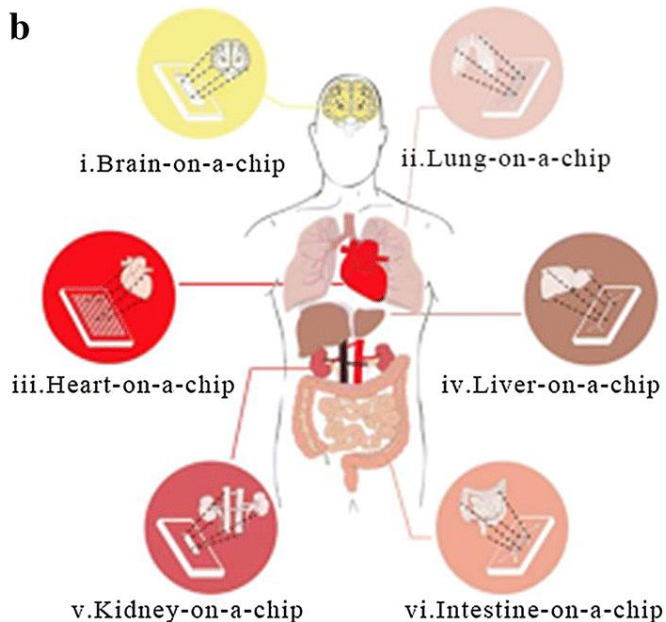
**Figura 8. a.** És el sistema de microfluids Transwell més tradicional. Està compost per una mono capa de cèl·lules Caco-2 i HT29-MTX simulant la barrera intestinal, una membrana porosa i dos compartiments; un apical i l'altre basal. La limitació que comporta aquesta és que les cèl·lules es conreen estàtic, ignorant la dinàmica de l'intestí. **b.** Sistema de microfluids més dinàmic, Transwell de flux. Consisteix en un co-cultiu de Caco-2 i HT29-MTX connectat a un sistema de flux que també està connectat a cromatografia líquida d'alt rendiment mitjançant unes vàlvules que permeten alternar mesures de la cromatografia de la part apical i basolateral. (19)

### 5.3.2. Organ-on-a-chip

Hi ha uns altres models molt recents anomenats *organ-on-a-chip* (OOAC) que consisteixen en un sistema d'òrgans construït sobre un xip microfluídic. D'aquesta manera es reflecteixen les característiques estructurals i funcionals del teixit humà en concret i es pot predir la resposta a una sèrie d'estímuls com per exemple, respostes a fàrmacs o efectes ambientals. (21)

OOAC combinat amb micromecanització i biologia cel·lular controla paràmetres externs i simula amb precisió entorns fisiològics (interns). Es requereixen tensions mecàniques dinàmiques com per exemple membranes elàstiques per crear tensions mecàniques periòdiques, fluids que permeten el cultiu dinàmic de les cèl·lules i gradients de concentració que simulen fenòmens biològics que desencadenen respostes. (21)

El funcionament del sistema és el següent tot i què depenent de l'òrgan que es modelitzi tindrà condicions específiques. El microfluid subministra les cèl·lules diana i descarrega els líquids residuals durant el cultiu de manera automatitzada. Les cèl·lules seran vives i estaran en cultiu 2D o 3D (normalment 2D). Les fonts dels teixits per als xips són cèl·lules mare embrionàries, cèl·lules mare pluripotents induïdes i cèl·lules mare adultes que es poden diferenciar i integrar en els xips microfluídics tant com per a línies cel·lulars o cultius cel·lulars primaris. A més, es poden afegir estímuls que o l'addició de fàrmacs. Hi ha una última part, el xip que serveix per a detectar dades. S'ha aplicat per a la reproducció de diferents òrgans tals com el cervell, pulmó, cor, fetge, ronyó i intestí. (21,22)

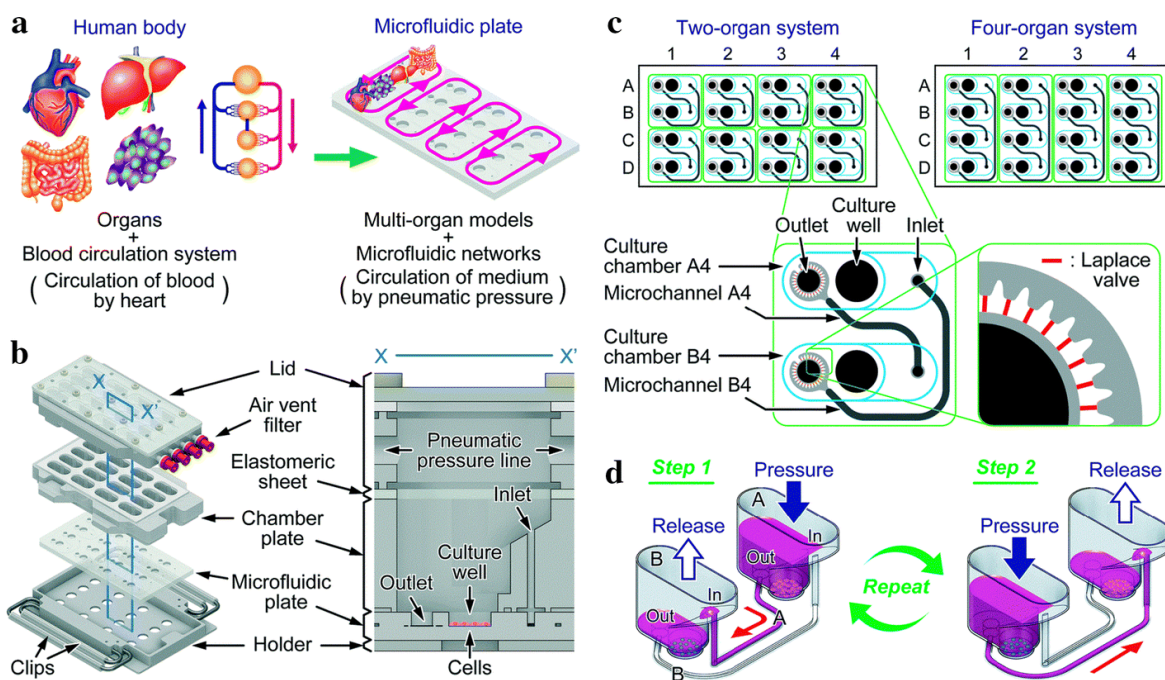


**Figura 9:** Representació del cos humà amb els corresponents xips que s'han aconseguit desenvolupar per simular el cervell, pulmó, cor, fetge, ronyó i intestí. (20)

Fins al moment, s'ha estat parlant de la simulació d'un òrgan per xip però existeix la possibilitat d'un xip multi-òrgan que s'anomena *human-on-a-chip*. Aquests últims són els més complexos de tots, poden incorporar fins a 10 òrgans i estan connectats entre ells a través d'un canal. Tot i ser



mètodes molt sofisticats, el seu cost econòmic és elevat i encara no estan preparats per a utilitzar-los rutinàriament. En la figura 10 se'n representen alguns exemples. (21)



**Figura 10:** **a.** Representació d'un sistema multi-òrgan en un xip; a la part esquerra de la fletxa es veuen els òrgans en un cos humà i com ells estan contactats amb la circulació sanguínia, a la part dreta de la fletxa està l'equivalent model desenvolupat per a simular el real. **b.** Representació esquemàtica d'un xip en l'interior; conté pressió, el cultiu cel·lular i l'entrada i sortida de fluids. **c.** Disseny de xips de 2 i 4 òrgans amb diversos sistemes de microfluids, les zones envoltades per verd representen el cultiu en circulació. **d.** Representa un sistema que imita les pressions pneumàtiques en dos òrgans.(21)

## 5.4. Aplicacions dels models alternatius a l'experimentació animal

### 5.4.1 Models utilitzats en cosmètica

Els productes cosmètics s'utilitzen per a millorar o alterar l'aspecte o fragància del cos, per això han d'estar sotmesos a una avaluació de risc per a la salut humana, inclòs l'avaluació de risc de la sensibilització de la pell. Històricament s'utilitzaven mètodes *in vivo* per identificar i caracteritzar la pell fins que el Reglament de la UE sobre cosmètics (CE) 1223/2009 va prohibir els tests amb animals vertebrats, regulat a més per l'ICCR. A conseqüència es van haver d'adoptar noves metodologies d'enfocament (NAM) i, amb el pas dels anys han adoptat una nova generació d'avaluació de riscos (NGRA). (23–25)

Hi ha un nivell inicial on implica una revisió exhaustiva de la informació existent com ara dades existents de la sensibilització, caracterització de la puresa i prediccions *in silico*. A continuació, es genera una hipòtesi: si és probable que una substància química sensibilitzi a la pell o no,



s'elegeix l'enfocament adequat i la disponibilitat de RAx.... En el cas que la informació existent no sigui suficient se'n genera d'addicional. Aquestes són proves específiques per millorar l'exposició o la generació de dades NAM *in vitro*. I, per últim, NGRA que caracteritza la incertesa i es compara amb l'exposició del consumidor, important per a generar confiança en els nous enfocaments d'avaluació de risc. (25)

Un aspecte important a tenir en compte en els cosmètics però que també es podria arribar a aplicar en medicaments és l'avaluació de toxicitat sistèmica aguda per via oral, dèrmica, inhalació, irritació de la pell i dels ulls i del potencial de sensibilització de la pell dels productes químics. Històricament aquests estudis es realitzaven *in vivo* amb models animals, tot i que la informació obtinguda d'aquestes proporciona les dades necessàries per complir les normatives de classificació i etiquetatge, té un valor limitat per a l'avaluació de riscos i perills. Gràcies al projecte A CuteTox (2009) es va donar un gran impuls a la determinació de toxicitat aguda. A continuació, es mostren una sèrie de mètodes *in vitro* acceptats concrets per a cada conjunt de paràmetres, tots ells estan dintre de la llibreria OECD. (24)

- Per mirar la corrosió en la pell s'han aprovat testos a partir de la reconstrucció epidèrmica humana (RhE), resistència elèctrica transcutània i d'un mètode de prova de barrera de membrana.
- La fototoxicitat s'aconsegueix amb cultius de fibroblasts 3T3
- Per la determinació dels danys oculars greus o la irritació ocular hi ha models d'opacitat i permeabilitat en còrnia bovina (BCOP), cèl·lules d'ull de pollastre aïllades i epiteli humà reconstruït de còrnia (RhCE), entre altres.
- Pel que fa a la sensibilització de la pell hi ha tests que aborden AOP sobre l'activació dels queratinòcits (NHKC) o de l'activació de les cèl·lules dendrítiques.
- En carcinogenicitat s'usen cèl·lules transformades d'embrions de hàmmster (SHE) o Bhas 42.
- Els controls de genotoxicitat es fan amb models *in vitro* amb mutacions de bacteris, aberracions cromosòmiques de mamífers i la mutació d'aquests gens amb *Hprt*, *xprt* i *Thymidine kinase*.
- La disrupció endocrina s'avalua amb assajos d'esteroïdogènesi H295R, assajos de transactivació per detectar receptors d'estrògens, entre altres.

## 5.4.2 Models utilitzats per als tests de toxicitat

### 5.4.2.1. Toxicitat reproductiva

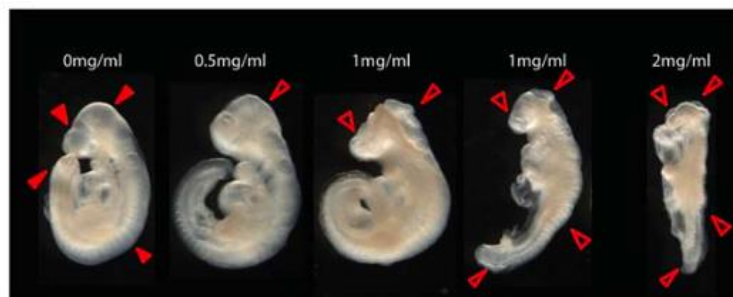
Per avaluar la salut reproductiva d'una població cal aplicar sistemes de proves ràpides que permetin cercar possibles substàncies tòxiques mitjançant proves multidireccionals tant ambientals com en biosubstrats (sang, fluids, etc.), predint així els possibles perills, en particular en el desenvolupament embrionari. Per tant, hi ha una necessitat de desenvolupar sistemes dissenyats per avaluar l'efecte de l'exposició no només a substàncies químiques específiques, sinó també a una combinació de factors desfavorables de l'embriogènesi humana. Tot i això, no hi ha sistemes universals i les proves individuals no poden reflectir tota la diversitat de respostes embrionàries a l'exposició. Els mètodes *in vitro* permeten provar l'activitat embriotòxica d'una substància directament sobre un embrió, independentment de com s'hagi modificat l'estructura i l'activitat de la substància en l'organisme de la mare. (1,26,27)

Els cultius embrionaris implica la introducció directa d'un agent de prova al medi de cultiu. Després de la incubació, es calculen els efectes induïts i els nivells tòxics i ineficaços de la mostra. El cultiu d'embrions *in vitro* permet avaluar un perill directe que l'agent de prova suposa per al fetus en desenvolupament, independentment de les possibles fluctuacions (genètiques o funcionals) de l'organisme de la mare. L'exposició directa d'embrions cultivats *in vitro* permet realitzar una avaluació morfofuncional del desenvolupament embrionari, determinar el llindar i les concentracions efectives, per determinar la funció d'efecte de concentració de temps, comparar les dades obtingudes amb les dades de farmacocinètica humana i donar un pronòstic de l'embriogènesi humana. L'avaluació morfofuncional del desenvolupament embrionari en cultiu es realitza mesurant els principals paràmetres de desenvolupament relacionats amb els processos de creixement, diferenciació corporal embrionària i processos morfofuncionals. (1,26,27)

L'ús d'embrions de ratolins com a model és un mètode ràpid per estimar les propietats embriotòxiques dels productes químics, ja que contenen poques estructures cel·lulars o sistemes autodeterminats. La majoria d'informació sobre els efectes patògens de diversos factors es pot obtenir estudiant embrions que es desenvolupen *in vitro* durant les fases inicials d'organogènesi, que són els més sensibles als agents perjudicials. (1,27)

L'ús d'embrions de ratolí postimplantacionals permet avaluar no només els efectes embriotòxics, sinó de genotoxicitat més sensible, com ara l'assaig de freqüència d'intercanvi de cromàtides

germanes (SCE). L'avaluació simultània d'aquests efectes en un model únic permet interrelacionar els impactes embriotòxics i mutagènics. (1,27)



**Figura 11.** Correspon a un estudi d'embriotoxicitat de LAR (*Largehead Atractylodes Rhizome*), il·lustra les malformacions o l'absència d'elles produïdes en l'embrió de ratolí per LAR en diferents concentracions. Concretament s'observen anomalies en els grups tractats de 0,5 a 2 mg/mL (27)

La toxicitat reproductiva va rebre un gran impuls gràcies al projecte europeu ReProTect (2009), on es potenciava el desenvolupament de models *in vitro* per a l'avaluació del risc de components en sistemes reproductius. Està dividit en diferents àrees tals com fertilitat femenina, fertilitat masculina, implantació i desenvolupament parental. A més, hi ha mètodes com l'anàlisi de proteomes, QSAR i microarrays. En tots aquests apartats s'utilitzen tècniques per veure els efectes causats per possibles tòxics sobre l'espermatogènesi, la fol·liculogènesi, la maduració i fecundació de les cèl·lules germinals, l'esteroidogènesi, el sistema endocrí, l'embrió preimplantacional, la placenta, la funció del úter i el desenvolupament embrionari. (28)

Un exemple d'aquest últim és l'ús d'organoides cerebrals, útils per provar la toxicitat cerebral fetal de molècules petites i altres productes químics. S'aconsegueix fer una reproducció del desenvolupament fetal del cervell humà i es compara els realitzats en rosegadors, generalment més cars, que consumeixen molt de temps, i no sempre representen la fisiopatologia humana real. (28)

Alguns dels mètodes que s'utilitzen en l'àrea de fertilitat són cultius rics en cèl·lules Leydig o Sertoli, assajos de fertilització *in vitro*, sistemes de cultiu cel·lular de Granulosa i Theca i assaig de maduració d'òvuls *in vitro*. En la implantació hi ha la prova amb cèl·lules Ishikawa (càncer d'endometri), cultiu de cèl·lules endotelials humanes, explants endotelials humans i cultiu de cèl·lules placentàries, a més, de definir-ne una línia cel·lular d'aquestes. També tenen importància en el desenvolupament prenatal ja que es fan cultius amb cèl·lules de carcinoma embrionari, blastòcits i altres cultius embrionaris de preimplantació, postimplantació de cultius

d'embrions sencers (WEC), cèl·lules mare embrionàries (ratolí i humà) i cèl·lules embrionàries transgèniques. (28)

A més a més, en el cas concret de la viabilitat es van utilitzar: el Bioassay fol·licular, l'assaig de maduració *in vitro* boví, l'assaig de fecundació *in vitro* bovina, l'assaig de periimplantació embrionària de ratolí, la prova de cèl·lules d'Ishikawa, cultius embrionaris sencers, la prova de cèl·lules mare embrionàries, l'assaig ReProGlo i diversos assaigs relacionats amb la disrupció endocrina. (28)

En toxicitat reproductiva també s'engloba l'ús de cultius cel·lulars per avaluar l'eficàcia de tractaments contra el càncer d'ovari. El càncer d'ovari és una de les principals causes de mort en pacients amb càncer femení degut a la quimiorresistència dels medicaments establerts, fent així necessari buscar noves alternatives. En la detecció de nous fàrmacs (com ja s'ha comentat en anterioritat) es realitzen proves de toxicitat i eficàcia *in vitro*, concretament amb sistemes de cultiu humans en 3D. Un dels models desenvolupats recentment consisteix en cèl·lules SKOV-3 3D adherit a hidrogels d'alginat i cultivats dintre d'un bioreactor dinàmic de fluids. SKOV-3 són una línia cel·lular contínua obtinguda a partir d'un tumor ovàric i el bioreactor dinàmic aconsegueix imitar el flux capil·lar que alimenta el tumor. Es van posar en contacte amb cisplatí i es va mirar la viabilitat amb l'assaig Alamar Blue, veient així que la supervivència de les cèl·lules baixava considerablement després de l'adició d'aquest. (29)

#### 5.4.2.2. Toxicologia neurològica

En toxicologia neurològica s'han desenvolupat models de mini-cervells humans desenvolupats per a incorporar unitats funcionals mínimes del cervell i recapitular indicis microfisiològics de cervells sans o malalts. En el sistema nerviós central (SNC), el lliurament eficient de productes terapèutics a través de la barrera hematoencefàlica (BBB) suposa un gran desafiament, però és clau per a trastorns neurodegeneratius, neuroinflamatoris o neuroendocrins. Els models de BBB humans han de predir amb precisió el transport de substàncies al cervell sent rellevant per a tots els estudis de toxicitat, farmacocinètica, farmacodinàmica i eficàcia relacionats amb el SNC.(20,30)

Però hi ha d'altres estratègies que es basen en la utilització de cèl·lules humanes. Aquestes poden ser cèl·lules progenitores neuronals primàries (hNPC), cèl·lules de la cresta neuronal (NCC) i cèl·lules LUHMES. A continuació, s'explicaran les raons per les quals se n'han desenvolupat models. En el cas de les NPC, és important la seva proliferació ja que quan aquesta

es veu alterada, degut a la infecció del virus Zika produeix microencefàlia en nens. A més a més, en el SNC també és importat el desenvolupament de les neurites sensibles a productes químics. De les NCC interessa la seva migració a les diferents parts de l'embrió, un cop allí es poden diferenciar a més de 100 tipus cel·lulars. Aquesta es pot veure afectada per factors genètics o per l'exposició a productes farmacèutics i pesticides. Les LUMHES (cèl·lules primàries immortalitzades) s'utilitzen per a avaluar els efectes dels productes químics en les neurites (axó o dendrita) i la contracció de les fibres de l'estrès. (20)

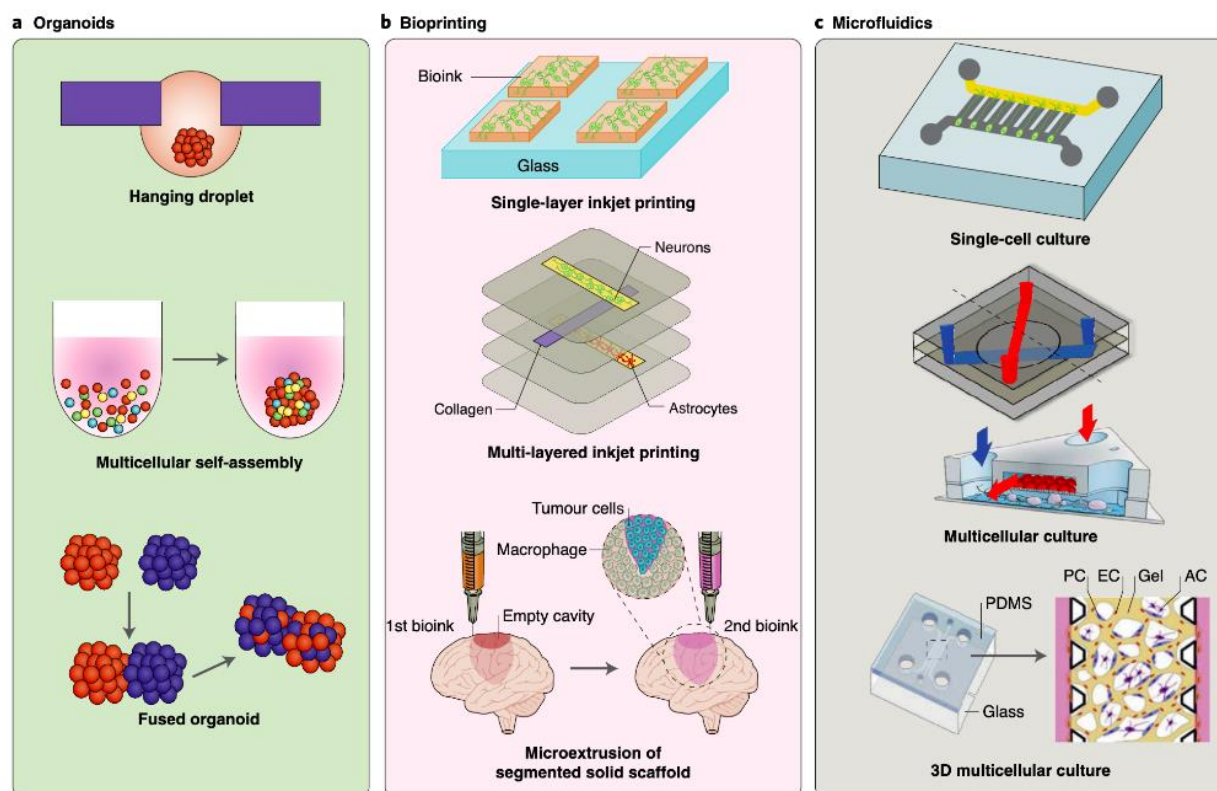
A continuació es mostren els models depenent de si són estàtics o dinàmics en funció de si hi ha presència o absència de dinàmica de fluids, tensions i intercanvis de nutrients i residus. (20,30)

- ESTÀTICS:

- *Placa de petri i sistemes Transwell*: En les plaques de petri es fan créixer cultius de cèl·lules neuronals, iPSC o cèl·lules mare neuronals 2D. Tot i això, no són adequades per a l'estudi de dosi-resposta i transport de medicaments. Per això, es van desenvolupar els sistemes Transwell, en ells poden haver-hi monocultius o co-cultius de cèl·lules endotelials, cèl·lules neuroglials o cèl·lules immunes. Però no engloben els intercanvis de nutrients, residus i compostos químics o fàrmacs.(30)
- *Cultiu organoide cerebral*: Són conjunts multicel·lulars que formen parcialment neuroarquitectures i interaccions cèl·lula-cèl·lula. Es pot aconseguir mitjançant 3 tècniques: *hanging droplet* on les cèl·lules de dins de la gota s'agrupen, autoensamblatge d'esferoides en un tub i fusió de dos organoides específics de la regió. Però també s'ha aconseguit formar els organoides cerebrals mitjançant molècules d'inducció neuronal per promoure l'agregació cel·lular i l'autoorganització de les cèl·lules mare adultes o les cèl·lules diferenciades de les iPSC (en plaques de petri o plaques amb baixa adhesió cel·lular). (30) En toxicologia neuronal s'usen habitualment neuroesferes 3D com a model d'estudi, simulant el cervell. Un exemple concret, seria la utilització de neuroesferes de cultiu primari de rata per a comparar els efectes d'exposició a una substància en diferents etapes del desenvolupament cel·lular i analitzant la viabilitat cel·lular.(31)
- *Bioimpressió*: Hi ha diferents tècniques i totes elles permeten una reproductibilitat alta i precisió en les estructures biològiques. N'és un exemple patrons impresos que donen suport al cultiu neuronal-glial que dirigeixen les interaccions cel·lulars, però també es poden aconseguir figures 3D com cèl·lules neuronals amb hidrogel proporcionant interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular necessàries en el desenvolupament del teixit neuronal.(30)

- DINÀMICS:

- *Sistemes accionats per bombes:* Per a què arribin tots els nutrients al cultiu hi ha d'haver una força que impulsi els microfluids i aquesta és una bomba col·locada a l'entrada o sortida del microxip, permetent el control de neurotransmissors. Les cèl·lules endotelials del BBB estan en constant estrès i pressió i s'ha desenvolupat un model que consisteix en un sistema complex compost per una matriu extracel·lular 3D, un cultiu dinàmic i un sistema d'automatització. Es diferencien les iPSC a cèl·lules endotelials cerebrals i es posen en un suport, a l'altre costat d'aquest s'hi troben suspeses en un fluid els astròcits, perícits i/o micròglies provinents també d'iPSC. A partir d'aquí, es poden obtenir dades com la permeabilitat de compostos, paràmetres d'expressió (RNA o proteïnes), perfils metabòlics o lipídics.(30)
- *Sistemes dinàmics sense bombes:* Són models més simples que els anteriors, però que permeten un flux continu, es pot aconseguir aprofitant la pressió hidrostàtica per a crear una diferència de pressió. Tot i això, són sistemes que costa de controlar i què tenen una caiguda de pressió del flux al llarg del temps.(30)



**Figura 12.** Principals tècniques per a la creació de mini-cervells humans **a.** Formació d'organoides a partir de 3 tècniques: *hanging droplet* on les cèl·lules de dins de la gota s'agrupen, autoensamblatge d'esferoides en un tub i fusió de dos organoides específics de la regió. **b.** Cultius cel·lulars impresos en 3D amb impressió d'una sola capa sobre una superfície, de capa per capa i en dos passos (primer s'imprimeix el model cel·lular amb macròfags i es deixa una cavitat buida on s'omple imprimint cèl·lules de glioblastoma seguit d'un tancament). **c.** Sistemes de cultiu microfluidics.

*El primer és un monocultiu de neurones, el segon és un dispositiu microfluídic amb una membrana per separar les cèl·lules endotelials cerebrals de les neurones i les cèl·lules glials i, el tercer és un sistema microfluídic de tres canals amb una regió central que conté cèl·lules endotelials humanes, perícits cerebrals i astròcits (derivats d'iPSC). (30)*

#### **5.4.3. Models in vitro per a l'estudi de la COVID-19**

Ja s'estan desenvolupant més de 115 vacunes contra COVID-19. El SARS-CoV2 és el virus inductor del COVID-19 sent així una amenaça actual generant una pandèmia i totes les conseqüències que comporta. Es per això que la inversió per al desenvolupament de nous fàrmacs ha augmentat i s'utilitza en enfocaments NAM per a la seguretat, eficàcia i avaluació de la qualitat dels medicaments. S'ha de tenir en compte que no hi ha un model animal de SARS-2-CoV-19. (32)

En aquests mètodes alternatius el que es busca és eficàcia, seguretat, qualitat i descobriment de dianes. Es parla d'eficàcia quan hi ha un bon candidat que interaccioni amb l'objectiu i que compleixi certes característiques. Les proves de seguretat han de garantir que no sigui un medicament tòxic avaluant els efectes adversos, no ha de provocar càncer i no ha d'interferir en altres medicaments. La toxicitat sobretot es basa en el concepte de dosis repetides. I un cop s'ha trobat el medicament, en aquest cas la vacuna es produeix en quantitats elevades i constantment i s'han de controlar les impureses i els contaminants.(32)

Per exemple, NAM pot predir la genotoxicitat (un aspecte important de la carcinogenicitat) i hi ha disponibles diversos organoides basats en cèl·lules humanes per provar la infectivitat del virus i els processos biològics que controlen ells. (32)

SARS-2-COVID-19 també es pot estudiar mitjançant neuroesferes 3D amb cèl·lules hNPC. A més, s'han estudiat els receptors vírics solubles (sACE2) com a teràpia amb organoides. Però, per a l'aparell respiratori s'utilitzen sistemes d'òrgan sobre xip. La infectivitat cel·lular es pot provar per exemple, amb cultius cel·lulars com la línia cel·lular Vero provinent de les cèl·lules epitelials de ronyó del mico verd Africà. La majoria d'organoides i sistemes microfisiològics no tenen un component immunitari per això l'addició de cèl·lules immunes (anticossos o sèrum d'humans recuperats) és cada cop més freqüent o cèl·lules de la resposta immune adaptativa.(32)

## 5.5. Validació dels mètodes alternatius a l'experimentació animal

### 5.5.1. Fonament

En la validació de RAX s'ha de demostrar que l'aproximació porta a un resultat esperat. Si un mètode no s'ha validat significa que es desconeix si compleix bé l'objectiu pel qual s'ha dissenyat. Aquest ha de complir els requeriments del mètode científic, és a dir, amb un disseny experimental clar, com per exemple, formular una hipòtesi, provar la hipòtesi, que sigui reproducible... En aquest punt és molt important la bibliografia ja feta fins al moment perquè dona dades provinents de mètodes ja validats que permet tenir una idea dels límits toxicològics o altres. Cada RAX requereix d'una avaluació específica que combina eines computacionals amb una barreja de química, QSAR, tècniques *in vivo* i *in vitro*. (11)

Una validació del mètode adequada amb la finalitat per la qual s'ha dissenyat es basa en l'establiment d'un conjunt de criteris quantificables, estàndards de rendiment i definició d'escenaris d'ús. Un dels criteris importants és la sensibilitat i l'especificitat de l'assaig, a més, de la robustesa on es mira la relació senyal/soroll de fons, els controls... (11,33)

El primer pas es basa en l'establiment d'un conjunt quantificable de criteris de preparació i es puntuen. Després es defineix l'escenari d'ús i també es puntua. La puntuació comparada amb la màxima accessible indica la disponibilitat del mètode de prova respecte a l'escenari donat de manera que s'obtenen puntuacions per a cada fase del mètode. Això permet distingir la preparació per, per exemple, fins a la investigació acadèmica, selecció i priorització o avaluació de riscos reglamentaris. (11,33)

A continuació, s'ha de fer tota una bateria de proves de toxicitat, per aquest motiu hi ha un a plantilla (ToxTemp) que conté informació per complir tots els requisits de GD211 (guia de qualitat específica), orienta sobre els tipus de respostes a la informació requerida i inclou criteris d'acceptació d'elements prova. (34)

Després es fa la justificació científica, és a dir, del disseny experimental seguint la següent estructura(33):

- (i) Caracterització del model / ajustat al propòsit
- (ii) Criteris de rendiment de la prova / robustesa
- (iii) Justificació biològica de la rellevància de les proves
- (iv) Justificació toxicològica de la rellevància de les proves



I per últim, s'han de detallar els 4 elements clau(33):

- (i) El sistema de prova
- (ii) L'esquema d'exposició
- (iii) El punt o punts finals de l'anàlisi
- (iv) El model de classificació

### 5.5.2. EURL ECVAM

La validació dels models la porten a terme òrgans especialitzats i un d'ells és el EURL ECVAM. Tal i com estableix la Directiva 2010/63 / UE el JRC dirigeix el laboratori de referència de la Unió Europea per a alternatives a proves animals (EURL ECVAM) que té les funcions següents:(35)

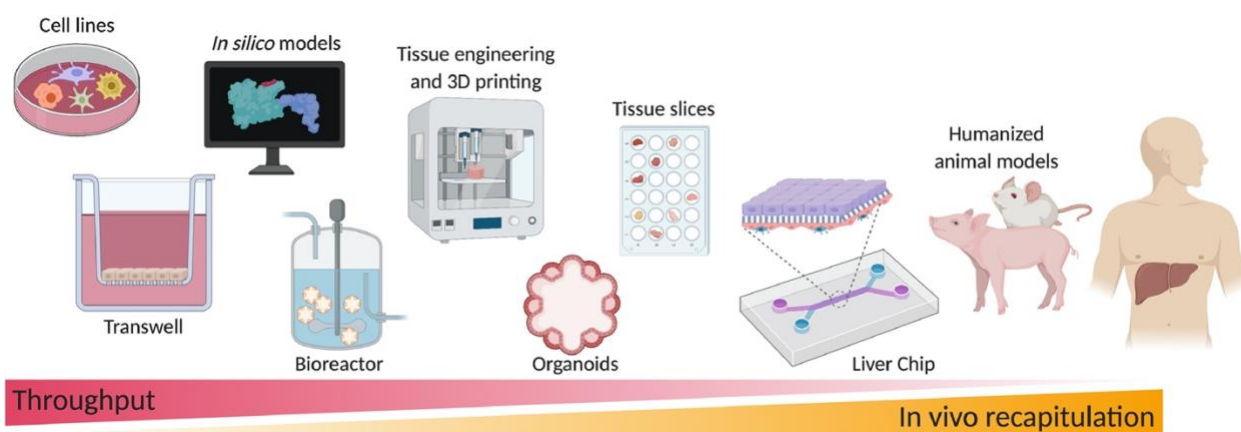
- Coordinació del desenvolupament i ús de mètodes alternatius, incloent de recerca bàsica i aplicada i proves reguladores
- Coordinació de la validació d'enfocaments alternatius a nivell de la UE
- Facilitar l'intercanvi d'informació sobre el desenvolupament d'enfocaments alternatius
- Mantenir i gestionar bases de dades públiques i sistemes d'informació sobre enfocaments alternatius i el seu estat de desenvolupament
- Promoure el diàleg entre legisladors, reguladors i tots els grups amb interessos rellevants (indústria, científics biomèdics, organitzacions de consumidors i grups de benestar animal).

El seu objectiu és donar suport actiu al desenvolupament, validació i acceptació de mètodes que substitueixin, redueixin i/o refinin l'ús d'animals al laboratori, és a dir, que compleixi les 3R. Ha establert una àmplia xarxa, com per exemple l'avaluació per la seguretat de productes químics (REACH), cosmètics, productes agroquímics, farmacèutics, biològics.

Com s'ha comentat, una de les funcions de EURL ECVAM és la gestió de les dades i per això, va crear una base de dades per als mètodes alternatius a l'experimentació animal. Aquesta compta de 396 documents dels quals se'n descriu el tipus de document, la temàtica, els models i les estratègies emprats, els *endpoints* biològics, els sistemes experimentals utilitzats i en el cas que pertanyen a algun projecte europeu a quin. Alguns dels models presentats s'engloben dintre del projecte europeu A CuteTox(36), RePRoTect(28), SEURAT-1(37) i EUToxRisk,. El primer té l'objectiu de demostrar proves *in vitro* de toxicitat sistèmica aguda humana, el segon se centra en les proves *in vitro* de toxicitat del sistema reproductiu el tercer té l'objectiu d'aprofundir amb noves aproximacions, englobant tècniques *in silico*, *in vitro* i *in chemico* igual què en l'últim.

## 6. DISCUSSIÓ

El cos humà és un dels sistemes més complexos i, de fet, hi ha mecanismes o relacions que encara suposen un enigma per a la comunitat científica. Per aquest motiu és necessari una constant investigació, per entendre com funcionen, les alteracions/patologies que poden provocar i el seu tractament. Per tant, una de les principals preocupacions a nivell de la societat és entendre tots els aspectes relacionats amb la salut i poder controlar els possibles perills als quals estem exposats al llarg de la vida. En aquest treball s'ha profunditzat amb els perills tòxics per tal de tenir eines i mecanismes per a poder identificar-los i fer una sèrie de proves en els productes abans de ser comercialitzats (Figura 13). Els primers estudis utilitzaven models animals extrapolables a humans per la seva proximitat i semblança, sent mètodes tradicionals, alguns dels quals difícils de substituir. Tot i això, hi ha una tendència a l'alça en substituir-los o si més no, reduir-los. Fins i tot, l'Agència de Protecció del Medi Ambient (EPA) de Washington va atorgar 4.25 milions de dòlars per avançar en la investigació dels mètodes alternatius i s'ha compromès a reduir el finançament d'estudis realitzats sobre mamífers un 30% per al 2025 i eliminar-lo totalment per al 2035 (38).



**Figura 13.** Representació esquemàtica dels models per representar el fetge però es podria aplicar a altres òrgans. Entre ells es troben línies cel·lulars, sistemes estàtics Transwell, models *in silico*, bioreactors (models dinàmics), impressió 3D, organoides, làmines de teixit, organ-on-a-chip, humanització de models animals i proves en humans.(22)

Les alternatives que sorgeixen es basen en mètodes de *read-across* (RAx), *new approach method* (NAM) i *Next-Generation Risk Assessment* (NGRA), tot un conjunt de proves *in silico* i *in vitro* per simular el comportament de la molècula dins del cos humà. Les proves poden cobrir certs nivells d'informació però no tots: les proves *in silico/in chemico* serveixen per als aspectes moleculars; els sistemes *in vitro* aconseguixen informació molecular, cel·lular, tissular i d'òrgan; els models *in vivo* permeten analitzar a nivell tissular, d'òrgan, d'organisme i de població. Tots ells han de ser validats i verificats abans de substituir els mètodes tradicionals i per això,

existeixen institucions que ho regulen com EURL ECVAM. S'ha demostrat que gràcies a l'aparició d'aquestes noves alternatives l'ús d'animals en experimentació s'ha reduït.

Pel que fa a les proves *in vitro* poden ser sistemes més o menys complexos depenent dels paràmetres que es volen obtenir dintre de les àrees toxicològiques següents: toxicitat per al desenvolupament, teratogenicitat, carcinogenicitat, mutagènesi, immunotoxicitat, neurotoxicitat i alteració endocrina, entre d'altres. Hi ha models cel·lulars simples que poden ser cultius cel·lulars primaris, línies cel·lulars contínues o cultius cel·lulars 3D. A més, si a aquests se'ls afegeix un grau de complexitat afegint microfluids o accions biofísiques es poden arribar a tenir sistemes més sofisticats. En els últims anys han augmentat el nombre de publicacions relacionades amb les impressions 3D i els multi-òrgans en un xip. Això es degut a què són models que requereixen microfluids, cultius cel·lulars, mecanitzacions i automatitzacions per simular cada cop més interaccions entre òrgans, tot i estar encara poc avançat. L'objectiu final seria poder integrar algunes de les tècniques compatibles per poder formar l'organisme humà sencer ja sigui en un xip o imprès. Aquests acaben sent sistemes molt cars i de molta complexitat.

Per tant, l'èxit dels sistemes *in vitro* és causada per l'especificitat de cada model per poder avaluar *endpoints* concrets. Altrament, per escollir els mètodes alternatius a l'experimentació animal a utilitzar s'ha de tenir en compte l'adequació d'aquests, ja que l'eficiència d'un sistema no es basarà en la complexitat del sistema sinó en què sigui capaç de respondre als objectius plantejats en un principi. Així doncs, s'ha de ser conscient que no cal utilitzar un sistema d'última generació i costós quan un de més senzill ja proporciona les mateixes conclusions.

Per finalitzar, m'agradaria remarcar que aquest treball ha suposat un gran avenç en mi del qual he extret diverses conclusions: En primer lloc, l'elecció del tema ha estat clau per al desenvolupament d'aquest, ja que des del primer moment m'ha despertat gran interès i he pogut aprendre molt ampliant els coneixements previs que ja tenia. En segon lloc, vull remarcar la importància de fer una bona cerca bibliogràfica perquè en l'actualitat l'avenç científic aconsegueix resultats en un termini curt de temps i disposa de gran quantitat d'informació, per això, és important utilitzar eines i estratègies que permeten trobar la informació adient a les nostres inquietuds i, a més, que aquesta sigui de qualitat. En tercer i últim lloc, considero que he complert satisfactòriament amb els objectius plantejats en un principi.

## 7. Bibliografia

1. Gupta P. Fundamentals of Toxicology. Elsevier; 2016. 422 p.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20150017750>
2. Comissió Europea. Informe de 2019 sobre las estadísticas relativas al uso de animales con fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea en 2015-2017. 2020;52. ISBN: 9789223306410
3. House J. Grouping of UVCB substances with new approach methodologies (NAMs) data. ALTEX. 2020;1–17. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/1994>
4. Busquet F, Kleensang A, Rovida C, Herrmann K, Leist M, Hartung T. New european union statistics on laboratory animal use - What really counts! ALTEX. 2020;37(2):167–86. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/1755>
5. Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya. Dades corresponents a l'any 2004. 2004;
6. Martín, R. Informe sobre l'ús d'animals en experimentació i altres fins científics incloent-hi la docència 2019. Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya ;1–5.
7. Shawn Pei Feng Tan ECYC and JCYC. Predicting human tissue exposures to xenobiotics using a bottom-up physiologically-based biokinetic model. ALTEX. 2020;38:1–17. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/2009>
8. Kirk RGW. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. Sci Technol Hum Values. 2018;43(4):622–48. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0162243917726579>
9. Moné MJ, Pallocca G, Escher SE, Exner T, Herzler M, Bennekou SH, et al. Setting the stage for next-generation risk assessment with non-animal approaches: the EU-ToxRisk project experience. Arch Toxicol. 2020;94(10):3581–92. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02866-4>
10. Gilmour N, Kern PS, Alépée N, Boislève F, Bury D, Clouet E, et al. Development of a next generation risk assessment framework for the evaluation of skin sensitisation of cosmetic ingredients. Regul Toxicol Pharmacol. 2020;116. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230020301471>
11. Rovida C, Barton-Maclaren T, Benfenati E, Caloni F, Chandrasekera PC, Chesné C, et al. Internationalization of read-across as a validated new approach method (NAM) for regulatory toxicology. ALTEX. 2020;37(4):579–606. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/1501>
12. ECHA. New Approach Methodologies in Regulatory Science. New Approach Methodologies in Regulatory Science. 2016. 1–63p. <http://echa.europa.eu/contact>
13. ECACC. Fundamental Techniques in Cell Culture. SIGMA Lab. 2008;1–61.
14. Sigma-Aldrich. Primary Cell Culture Basics [cited 2021 Jan 14]. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html>

15. Sigma-Aldrich. HeLa Cell Line human 93021013, epitheloid cervix carcinoma. [cited 2021 Jan 14]. [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_93021013?lang=es&region=ES](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_93021013?lang=es&region=ES)
16. Sigma-Aldrich. 3D Organoid Culture: New In Vitro Models of Development and Disease [cited 2021 Jan 14]. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/3d-organoid-culture.html>
17. Sigma-Aldrich. Overview of 3D Cell Culture: Tools and Techniques [cited 2021 Jan 14]. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/3d-cell-culture-technology.html>
18. Del Favero G, Kraegeloh A. Integrating Biophysics in Toxicology. *Cells*. 2020;9(5):1–25. <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1282>
19. Santbergen MJC, van der Zande M, Gerssen A, Bouwmeester H, Nielen MWF. Dynamic in vitro intestinal barrier model coupled to chip-based liquid chromatography mass spectrometry for oral bioavailability studies. *Anal Bioanal Chem*. 2020 Feb 21;412(5):1111–22. <http://link.springer.com/10.1007/s00216-019-02336-6>
20. Appelt-Menzel A, Oerter S, Mathew S, Haferkamp U, Hartmann C, Jung M, et al. Human iPSC-Derived Blood-Brain Barrier Models: Valuable Tools for Preclinical Drug Discovery and Development? *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2020;55(1):e122. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpsc.122>
21. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, et al. Organ-on-a-chip: Recent breakthroughs and future prospects. *Biomed Eng Online*. 2020;19(1):1–19. <https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>
22. Moradi E, Jalili-Firoozinezhad S, Solati-Hashjin M. Microfluidic organ-on-a-chip models of human liver tissue. *Acta Biomater*. 2020;116:67–83. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.08.041>
23. Cosmetics | Creative Bioarray. [cited 2021 Jan 14]. <https://www.creative-bioarray.com/Cosmetics.htm>
24. Table F, Accepted I, Test A, Products M, Testing IS, The C, et al. Inventory of validated Alternatives to Animal Testing applicable for cosmetic products and their ingredients in all ICCR Regions Human health Test Method Description / OECD Testing Guideline ( TG ). 2020;1–4.
25. Tourneix F, Alépée N, Detroyer A, Eilstein J, Ez-Zoubir M, Teissier SM, et al. Skin sensitisation testing in practice: Applying a stacking meta model to cosmetic ingredients. *Toxicol Vitro*. 2020 Aug;66:104831. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233319309476>
26. Hogberg HT, de Cássia da Silveira E Sá R, Kleensang A, Bouhifd M, Cemiloglu Ulker O, Smirnova L, et al. Organophosphorus flame retardants are developmental neurotoxicants in a rat primary brainsphere in vitro model. *Arch Toxicol*. 2020;(0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02903-2>
27. Tang LY, Li L, Borchert A, Lau CBS, Leung PC, Wang CC. Molecular studies of the congenital malformation induced by Largehead Atractylodes Rhizome, the most commonly used Chinese medicine for threatened miscarriage. *Mol Hum Reprod*. 2012;18(12):585–92. <https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gas034>

28. ECVAM. EU Integrated Project - ReProTect - Development of a Novel Approach in Hazard and Risk Assessment for Reproductive Toxicity by a Combination and Application of In Vitro, Tissue and Sensor Technologies (2004 - 2009). 2011;1–4. [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/view\\_doc.cfm?iddoc=102&tdoc=val](http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/view_doc.cfm?iddoc=102&tdoc=val)
29. Marrella A. 3D fluid-dynamic ovarian cancer model resembling systemic drug administration for efficacy assay. *ALTEX*. 2020;37:1–14. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/1745>
30. Tan H-Y, Cho H, Lee LP. Human mini-brain models. *Nat Biomed Eng*. 2020 Dec 14 [cited 2021 Jan 21];1–15. <https://www.nature.com/articles/s41551-020-00643-3>
31. Zhong X, Harris G, Smirnova L, Zufferey V, Sá R de C da S e., Baldino Russo F, et al. Antidepressant Paroxetine Exerts Developmental Neurotoxicity in an iPSC-Derived 3D Human Brain Model. *Front Cell Neurosci*. 2020;14(February):1–11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2020.00025/full>
32. Busquet F, Hartung T, Pallocca G, Rovida C, Leist M. Harnessing the power of novel animal-free test methods for the development of COVID-19 drugs and vaccines. *Arch Toxicol*. 2020;94(6):2263–72. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02787-2>
33. Masjosthusmann S, Blum J, Bartmann K, Dolde X, Holzer A, Stürzl L, et al. Establishment of an a priori protocol for the implementation and interpretation of an in-vitro testing battery for the assessment of developmental neurotoxicity. *EFSA Support Publ*. 2020;17(10). <http://doi.wiley.com/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1938>
34. Krebs A, Waldmann T, Wilks MF, van Vugt-Lussenburg BMA, van der Burg B, Terron A, et al. Template for the description of cell-based toxicological test methods to allow evaluation and regulatory use of the data. *ALTEX*. 2019;36(4):682–99. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/1433>
35. EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing | EU Science Hub. [cited 2021 Jan 22]. <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam>
36. Creton S, Dewhurst IC, Earl LK, Gehen SC, Guest RL, Hotchkiss JA, et al. Acute toxicity testing of chemicals - Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(1):50–83. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408440903401511>
37. Richarz A, Berggren E. SEURAT-1 Tools & Methods Catalogue. Vol. 1. 2016. [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC102532/method catalogue pubsy-final.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC102532/method%20catalogue%20pubsy-final.pdf)
38. US EPA O. Administrator Wheeler Signs Memo to Reduce Animal Testing, Awards \$4.25 Million to Advance Research on Alternative Methods to Animal Testing. [cited 2021 Jan 22]; <https://www.epa.gov/newsreleases/administrator-wheeler-signs-memo-reduce-animal-testing-awards-425-million-advance>